

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2001278894
PUBLICATION DATE : 10-10-01

APPLICATION DATE : 29-03-00
APPLICATION NUMBER : 2000091867

APPLICANT : UEMATSU TOSHIHIKO;

INVENTOR : UEMATSU TOSHIHIKO;

INT.CL. : C07K 7/08 A61K 38/00 A61P 9/10 C07K 5/097 C07K 5/117 C07K 7/06

TITLE : MEDICINAL COMPOSITION FOR PREVENTING AND/OR TREATING BLOOD CIRCULATION DISORDER AND PEPTIDE AS ACTIVE INGREDIENT FOR THE COMPOSITION

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a medicinal composition which contains as an active ingredient a peptide having a structure common to HSP 20 peptide known as one of human stress proteins and is effective for blood circulation disorders, cerebrovascular disorders, peripheral vascular disorders, and the like.

SOLUTION: It was found that an amino acid sequence placed within the amino acid range of -5 to +6 from serine placed at No. 16 amino acid position from the NH₂-terminal of human HSP 20, or a certain amino acid sequence among amino acid sequences starting from tryptophan at No. 9 amino acid position from the NH₂-terminal of the amino acid sequence of α B crystallin highly homologous to the human HSP 20 had a high blood platelet coagulation inhibiting action and/or a blood coagulation time-extending action due to the stimulation of prothrombins.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-278894

(P2001-278894A)

(43) 公開日 平成13年10月10日 (2001.10.10)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

FI

テ-マ-ト (参考)

C 0 7 K 7/08

ZNA

C 0 7 K 7/08

ZNA

4 C 0 8 4

A 6 1 K 38/00

A 6 1 P 9/10

4 H 0 4 5

A 6 1 P 9/10

C 0 7 K 5/097

C 0 7 K 5/097

5/117

5/117

7/06

審査請求 未請求 請求項の数 8 OL (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2000-91867(P2000-91867)

(22) 出願日

平成12年3月29日 (2000.3.29)

(71) 出願人 500140275

小澤 修

愛知県春日井市橋木町3丁目-47

(71) 出願人 500140286

松野 浩之

岐阜県本巣郡北方町高屋白木2丁目60

(71) 出願人 500140297

丹羽 雅之

岐阜県岐阜市岩田西1-628

(74) 代理人 100088616

弁理士 渡邊 一平 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液循環障害予防および/または治療用医薬用組成物並びにその有効成分であるペプチド

(57) 【要約】

【課題】 ヒトのストレス蛋白質の1種として知られているHSP20ペプチドと共通の構造を有するペプチドを有効成分とする循環器障害、脳血管障害、末梢血管障害等に有効な医薬用組成物の提供。

【解決手段】 ヒトHSP20のNH₂-末端から16番目に位置するセリンを中心として同セリンから…5ないし+6に位置するアミノ酸配列、あるいはHSP20と高い相同性を示すαBクリスタリンのアミノ酸配列のNH₂-末端から9番目に位置するトリプトファンから始まるアミノ酸配列の内、ある種のアミノ酸配列が高い血小板凝集抑制作用、および/またはプロトロンビン刺激による血液凝固時間を延長する作用を有することを見出して、上記課題を達成。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトHSP20のNH₂-末端のメチオニンから16番目に位置するセリンを基準として数えて-5から+6までのアミノ酸配列（配列番号1）で示されるアミノ酸の内、そのNH₂-末端側に、少なくとも-5~-3に位置する3連続アミノ酸配列Trp Leu Arg（配列番号10）、もしくは、-4から+2に位置する7連続アミノ酸配列Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro（配列番号13）で示されるアミノ酸を含むペプチド、または、HSP20ペプチドと高い相同性を示すαBクリスタリンのアミノ酸配列の内、NH₂-末端のメチオニンから数えて9番目に位置するトリプトファンから始まり、17番目に位置するフェニルアラニンまでのアミノ酸配列で示されるアミノ酸を少なくとも6連続して含み、かつ、そのNH₂-末端側に、少なくとも9番目に位置するトリプトファンから14番目に位置するフェニルアラニンまでの6連続アミノ酸配列Trp Ile Arg Arg Pro Phe（配列番号26）で示されるアミノ酸を含むペプチドを有効成分として含むことを特徴とする血液循環障害予防および/または治療用医薬用組成物。

【請求項2】 上記アミノ酸配列Trp Leu Argを含むペプチドが配列番号1~10に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸からなるものであることを特徴とする請求項1に記載の血液循環障害予防および/または治療用医薬用組成物。

【請求項3】 上記アミノ酸配列アミノ酸配列Leu Arg Arg Ala Ser Ala Proを含むペプチドが配列番号11~13に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸からなるものであることを特徴とする請求項1に記載の血液循環障害予防および/または治療用医薬用組成物。

【請求項4】 上記アミノ酸配列Trp Ile Arg Arg Pro Pheを含むペプチドが配列番号23~26に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸からなるものであることを特徴とする請求項1に記載の血液循環障害予防および/または治療用医薬用組成物。

【請求項5】 ヒトHSP20のNH₂-末端のメチオニンから数えて16番目に位置するセリンを基準として、-5から+6までに位置するアミノ酸配列アミノ酸配列（配列番号1）で示されるアミノ酸の内、そのNH₂-末端側に、少なくとも-5~-3に位置する3連続アミノ酸配列Trp Leu Arg（配列番号10）、もしくは、-4から+2に位置する7連続アミノ酸配列Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro（配列番号13）で示されるアミノ酸を含むペプチド、または、HSP20ペプチドと高い相同性を示すαBクリスタリンのアミノ酸配列の内、NH₂-末端のメチオニンから数えて9番目に位置するトリプトファンから始まり、17番目に位置するフェニルアラニンまでのアミノ酸配列で示されるアミノ酸を少なくとも6連続して含み、かつ、そのNH₂-末端側に、少なくとも9番目に位置するトリプトファンから1

4番目に位置するフェニルアラニンまでの6連続アミノ酸配列Trp Ile Arg Arg Pro Phe（配列番号26）で示されるアミノ酸を含むペプチド。

【請求項6】 配列番号1~10に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸からなるペプチド。

【請求項7】 配列番号11~13に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸からなるペプチド。

【請求項8】 配列番号23~26に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸からなるペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、循環器障害、脳血管障害、末梢血管障害等に有効な医薬用組成物、特に、ヒトのストレス蛋白質の1種として知られているヒトHSP20の一部のペプチドと共通の構造を有するペプチドを有効成分とする医薬用組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、ストレス蛋白質（ヒートショックプロテイン）は、細胞内で分子シャペロンとして作用すると考えられていた。一方、ヒト由来の分子量20キログルトンの蛋白質であるHSP20を新たな低分子量HSPとして精製し、その特質を同定し、そのアミノ酸配列を報告している（Kato, K., et al., J. Biol. Chem. 269: 15302-15309, 1994: 文献1）。さらに、血管平滑筋細胞における環状ヌクレオチド依存性の弛緩作用に、ある種の分子量20キログルトンからなる蛋白質のリン酸化が関与していることが知られていたが、その正体はHSP20であることがA. C. Beall等により明らかとされた（Beall, A. C., et al., J. Biol. Chem. 272: 11283-11287, 1997: 文献2）。本発明者等は、ヒトHSP20が、細胞外において、ボトロセチン（Botrosetin）やトロンビン（thrombin）に誘導された血小板凝集作用を阻害する作用を有することを既に報告している（Matsuno, H. et al., FEBS Letters, 429: 327-329, 1998: 文献3）。しかし、同時に使用した低分子量HSPの1種であるHSP27は、活性を示さなかった。

【0003】 その後の研究によれば、HSP20を構成するペプチドの内、NH₂-末端のメチオニンから16番目に位置するセリンがリン酸化されることが明らかにされ、さらに、同ペプチドのアミノ酸配列の内、同セリンを含むアミノ酸配列Trp Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu Lys（NH₂-末端のメチオニンから11番目~22番目までのアミノ酸配列に、さらに22番目のロイシンのCOOH-末端にリジンを結合させたもの）からなるペプチドのセリン残基がリン酸化されると血管平滑筋細胞を弛緩させることが報告されている（Beall, A., et al., J. Biol. Chem. 274: 11344-11351, 1999: 文献4）。しかしながら、上記の何れの報告にも、ヒトHSP20を構成するペプチドのアミノ酸配列の内、特定のアミノ酸配列が血小板凝集作用を阻害

する活性を示すことは、開示されていない。勿論、特定のアミノ酸配列がこの様な作用を有することを示唆する記載もない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 循環器障害、脳血管障害、末梢血管障害等に有効な医薬用組成物、特に、ヒトのストレス蛋白質の1種として知られているヒトHSP20のペプチドのアミノ酸配列と共通のアミノ酸配列を有するペプチドを有効成分とする循環器障害、脳血管障害、末梢血管障害等に有効な医薬用組成物を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 そこで、本発明者等は、ヒトHSP20の一部と共通の構造を有するペプチドであって、循環器障害、脳血管障害、末梢血管障害等に有効な医薬用組成物を見出すべく、種々検討の結果、ヒトHSP20のNH₂-末端から16番目に位置するセリンを中心として同セリンから-5ないし+6に位置するアミノ酸配列、あるいはHSP20ペプチドと高い相同性を示すαBクリスタリンのアミノ酸配列のNH₂-末端から9番目に位置するトリプトファンから始まるアミノ酸配列の内、ある種のアミノ酸配列がトロンビン刺激による血小板凝集に対する強力な抑制作用、および/またはプロトロンビン刺激による血液凝固時間を延長する作用を有することを見出して、本発明を完成させたものである。

【0006】 すなわち、循環器障害、脳血管障害、末梢血管障害等に有効な医薬用組成物の有効成分として有用なペプチド類を見出し、これらのペプチドを含む医薬用組成物が、循環器障害、脳血管障害、末梢血管障害等の予防や治療、特に、循環器障害の分野においては、不安定狭心症、心筋梗塞の予防、PTCA（経皮冠動脈形成術）後の冠動脈閉塞の予防、冠動脈バイパス手術後のグラフト閉塞予防、心房細動による脳塞栓予防、および人工弁置換術後の血栓形成予防などに、また、脳血管障害の分野においては、一過性脳虚血発作（TIA）の再発防止、さらに、末梢血管障害の分野においては、下部深部静脈血栓症、肺閉塞症の治療および予防、血行再建術後の閉塞予防、閉塞性血栓性血管炎、閉塞性動脈硬化症等の予防や治療用に有望なことを見出し、本発明を完成させたものである。

【0007】 かくして、本発明によれば、ヒトHSP20のNH₂-末端のメチオニンから16番目に位置するセリンを基準として数えて-5から+6までのアミノ酸配列（配列番号1）で示されるアミノ酸の内、そのNH₂-末端側に、少なくとも-5～-3に位置する3連続アミノ酸配列Trp Leu Arg（配列番号10）、もしくは、-4から+2に位置する7連続アミノ酸配列Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro（配列番号13）で示されるアミノ酸を含むペプチド、または、HSP20ペプチドと高

い相同性を示すαBクリスタリンのアミノ酸配列の内、NH₂-末端のメチオニンから数えて9番目に位置するトリプトファンから始まり、17番目に位置するフェニルアラニンまでのアミノ酸配列で示されるアミノ酸を少なくとも6連続して含み、かつ、そのNH₂-末端側に、少なくとも9番目に位置するトリプトファンから14番目に位置するフェニルアラニンまでの6連続アミノ酸配列Trp Ile Arg Arg Pro Phe（配列番号26）で示されるアミノ酸を含むペプチドを有効成分として含むことを特徴とする血液循環障害予防および/または治療用医薬用組成物が提供されることとなる。

【0008】 さらに、上記アミノ酸配列Trp Leu Argを含むペプチドが配列番号1～10に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸からなるペプチドおよび同ペプチドを有効成分として含むことを特徴とする血液循環障害予防および/または治療用医薬用組成物、上記アミノ酸配列Leu Arg Arg Ala Ser Ala Proを含むペプチドが配列番号11～13に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸からなるペプチド、および同ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする血液循環障害予防および/または治療用医薬用組成物、上記アミノ酸配列Trp Ile Arg Arg Pro Pheを含むペプチドが配列番号23～26に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸からなるペプチド、および同ペプチドを有効成分として含有することを特徴とする血液循環障害予防および/または治療用医薬用組成物が提供されることとなる。

【0009】

【発明の実施の形態】 以下、本発明につき詳述する。なお、本明細書において、ヒトHSP20とは、低分子量ストレス蛋白質ファミリーの一員であるヒト由来の分子量20キログルトンの蛋白質をいう。また、記号-または+は、文献4で報告されているヒトHSP20のアミノ酸配列の内、環状ヌクレオチド依存性血管弛緩作用に関与するリン酸化部位として知られているヒトHSP20のNH₂-末端のメチオニンから数えて16番目に位置するセリンを基準（0）として、NH₂-末端側に数えたときの位置には、-を、COOH-末端側に数えたときの位置には、+を付けて表示するものとする。

【0010】 従って、ヒトHSP20において、例えば、-5のアミノ酸とは、16番目に位置するセリンからNH₂-末端側に数えたとき、5番目に位置するアミノ酸、即ち、NH₂-末端のメチオニンから数えて11番目に位置するトリプトファンを意味するものである。また、-5から+6までのアミノ酸配列とは、NH₂-末端のメチオニンから数えて11番目に位置するトリプトファンから、16番目のセリンを含み、22番目のロイシンまでのアミノ酸配列をいい、特に記載がない場合には、これらの配列の内、いずれかを所定以上連続して含むアミノ酸配列を意味するものと理解されたい。

【0011】 ところで、本発明者らは、文献4で報告

されているヒトHSP20の環状ヌクレオチド依存性血管弛緩作用に関与するリン酸化部位として知られているヒトHSP20のNH₂-末端のメチオニンから数えて16番目に位置するセリンに注目し、そのセリンから数えて-5個から+6個までのアミノ酸配列に含まれる一連のアミノ酸配列からなるペプチドを主体に、その生理活性を検定した。さらに、ヒトHSP20のアミノ酸配列と相同性の高いαBクリスタリンのアミノ酸配列のうち、NH₂-末端のメチオニンから数えて9番目に位置するトリプトファンから始まるアミノ酸配列を有するペプチドも検定に使用した。これらのペプチドおよびアミノ酸は、表1および表2に示す。

【0012】 即ち、これらのペプチドおよびアミノ酸を化学合成し、下記した試験条件で、各被検物質の血小板凝集阻害作用を検定した。なお、表1および表2に示

したペプチドの内、アミノ酸が4個以上結合したペプチドは、その効果の如何に拘わらずすべてを、また、3個のアミノ酸からなるペプチドでも有効な作用を示したもののについては、配列表にそのアミノ酸配列を、配列番号1～27として示した。また、ペプチドは、Atherton、E.等によるSolid phase peptide synthesis : a practical approach, IRS PRESS (1989) PP. 25 - 161に記載の固相合成法(F-moc solid phase method)に従い合成した。精製は、Rainin Instrument Co., Inc.製のカラムを使用した逆相HPLCにより行った。なお、確認は島津製作所製のKratos Kompact MALDI 2を使用して、行った。

【0013】

【表1】

アミノ酸配列

被検物質
番号

| | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | Trp | Leu | Arg | Arg | Ala | Ser | Ala | Pro | Leu | Pro | Gly | Leu |
| 2 | Trp | Leu | Arg | Arg | Ala | Ser | Ala | Pro | Leu | Pro | Gly | |
| 3 | Trp | Leu | Arg | Arg | Ala | Ser | Ala | Pro | Leu | Pro | | |
| 4 | Trp | Leu | Arg | Arg | Ala | Ser | Ala | Pro | Leu | | | |
| 5 | Trp | Leu | Arg | Arg | Ala | Ser | Ala | Pro | Leu | | | |
| 6 | Trp | Leu | Arg | Arg | Ala | Ser | Ala | Pro | | | | |
| 7 | Trp | Leu | Arg | Arg | Ala | Ser | Ala | | | | | |
| 8 | Trp | Leu | Arg | Arg | Ala | | | | | | | |
| 9 | Trp | Leu | Arg | Arg | | | | | | | | |
| 10 | Trp | Leu | Arg | | | | | | | | | |
| 11 | Trp | Leu | | | | | | | | | | |
| 12 | | Leu | Arg | | | | | | | | | |
| 13 | Trp | | | | | | | | | | | |
| 14 | | Leu | | | | | | | | | | |
| 15 | | | Arg | | | | | | | | | |
| 16 | | Leu | Arg | Arg | Ala | Ser | Ala | Pro | Leu | Pro | Gly | Leu |
| 17 | | Leu | Arg | Arg | Ala | Ser | Ala | Pro | Leu | Pro | | |
| 18 | | Leu | Arg | Arg | Ala | Ser | Ala | Pro | | | | |

【0014】

【表2】

[illegible]

血小板凝集測定器械(Hema Tracer 801、NBS)を使用

し、トロンビン刺激による血小板凝集能を光透過度を指標として検定する。上記3で調製したPRPをマイクロキュベットに200 μ l量りとり、このキュベットを測定器の測定部位に入れ透過度を計る。この際の光透過率を100%に設定する。ついで、PRP (PRP160 μ l+リン酸緩衝液40 μ l)を別のキュベットに入れ、これを測定すると溶液中に浮遊する血小板のために光透過度が減少する。この時の透過率を0%に設定する。この間、PRPは攪拌棒によってキュベット内で800rpmで攪拌されている。血小板を刺激する物質としてトロンビンを加えると刺激を受けた血小板は凝集塊を作り、下に沈殿する。この結果浮遊している血小板が減少して光の透過率が上昇する。

【0019】 この変化によって血小板凝集能を算出する。トロンビンの加える量は体積比で10% (20 μ l)、濃度は溶液中最終濃度で0.06単位/ml～0.2単位/mlである。この濃度は80～90%の透過率の上昇をもたらすトロンビンの濃度を各血液サンプル毎にそれぞれに設定する。各被検材料としての合成ペプチドの濃度は、10～300 μ M (最終キュベット内濃度)とし、加える体積比は10% (20 μ l)である。キュベット内に各濃度の合成ペプチド溶液を加えたPRP (PRP160 μ l+ペプチド20 μ l)を入れて3～4分37℃でインキュベーションする。ついで、トロンビンを加え光透過率の変化で血小板凝集の抑制作用を検討する。

【0020】 5. 血液凝固試験

上記3で調製したPRPをサンプルとして使用し試験する。血液の凝固時間の測定は、Blood Coagulation Analyzer CA-100 (Sysmex)を使用して測定する。試薬としてヒトプロトロンビン (トロンボプラスチン・Cプラス、Sysmex)を用いる。上記3で調製したPRP100 μ lを専用キュベットに量りとり、3分間37℃でインキュベートする。ついで、試薬200 μ lを加え、素速く専用ボルテックスで軽く攪拌したのち、測定部へキュベットをセットする。測定は、光透過度の変化で血液凝固時間を測定する。健康人の平均測定時間が、11秒～12秒の範囲内となるように、この測定器は予め調整されている。

【0021】 6. 結果

表1および表2に示したペプチドを使用して、トロンビン刺激による血小板凝集抑制作用、およびプロトロンビン刺激による凝固時間延長作用を検討した。各被検物質番号1～27のペプチドのサンプルを300 μ M使用した時の結果を図1のグラフに示した。ただし、結果は、被検物質番号1～27について、各血液サンプルの測定値の平均値を用いて示してある。なお、対照には、緩衝液を用いた。血小板凝集率が対照に比べて低いほど、そのペプチドの血小板凝集抑制作用が強いことが示唆される。

【0022】 表1および表2に示した被検物質番号1～5、16、17 (配列番号1～5、11、12)のペプチドでは、血小板凝集は90～98%抑制された。ついで、被検物質番号6～10、18 (配列番号6～10、13)では、20～70%が抑制された。他のペプチドでは抑制は観察されなかった。一方、凝固時間 (プロトロンビン時間)の延長は、対照に比較して19～24%の延長が被検物質番号1～10 (配列番号1～10)で見られ、それ以外は全く観察されなかった。なお、セリンのリン酸化による影響について検討するために、これらのペプチド配列中のセリンをリン酸化したものも使用したが、リン酸化の有無は、血小板凝集抑制作用、凝固時間延長作用に何ら影響しなかった。

【0023】 ヒトHSP20のアミノ酸配列と相同性の高い α BクリスタリンのNH₂-末端のメチオニンから数えて9番目に位置するトリプトファンから始まり、最長17番目に位置するフェニルアラニンまでのアミノ酸配列を有するペプチドである被検物質番号28～32 (配列番号23～27)も化学的に合成し、トロンビン刺激による血小板凝集抑制作用、およびプロトロンビン刺激による凝固時間延長作用を検討した。各ペプチド30 μ M使用時の結果をグラフに示した。対照には、緩衝液を用いた。被検物質番号28、29、30および31 (配列番号23～26)のペプチドについて血小板凝集抑制作用が観察された。被検物質番号28～32 (配列番号23～27)のペプチドには、凝固時間の延長がみられた。被検物質番号28、29、30および31 (配列番号23～26)の血小板凝集に対する抑制作用は、ヒトHSP20ペプチドの内の以下に詳述する特定アミノ酸配列を有する上記被検物質番号1～10 (配列番号1～10)のペプチドに比較して、10倍強力であった。

【0024】 図1と図2に示す結果から、文献4で報告されているヒトHSP20の環状ヌクレオチド依存性血管弛緩作用に関与するリン酸化部位として知られているヒトHSP20のNH₂-末端のメチオニンから数えて16番目に位置するセリンから数えて-5個～+6個までのアミノ酸配列 (配列番号1)で示されるペプチドの内、ヒトHSP20のNH₂-末端のメチオニンから数えて16番目に位置するセリンから数えて-5から+3までの3連続のアミノ酸配列TrpLeu Arg (配列番号10)を少なくとも含み、場合によっては、さらに-2から最長+6までのアミノ酸配列を含んでもよいペプチド、あるいは、-4から+2までの7連続アミノ酸配列Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro (配列番号13)を少なくとも含み、場合によっては、最長+6番目に位置するロイシンまでの配列を含んでもよいペプチド、または、HSP20ペプチドと高い相同性を示す α Bクリスタリンのアミノ酸配列の内、NH₂-末端のメチオニンから数えて9番目に位置するトリプトファンから始ま

り、少なくとも14番目に位置するフェニルアラニンまでの6連続アミノ酸配列Trp Ile Arg Arg Pro Phe (配列番号26)、場合によっては、さらに15番目に位置するフェニルアラニンから最長17番目に位置するフェニルアラニンまでのアミノ酸配列を有するペプチドが血小板凝集抑制作用、および/またはプロトロンビン刺激による血液凝固時間を対照に比較して延長する作用を有することが明らかとなった。

【0025】 すなわち、ヒトHSP20のNH₂-末端のメチオニンから16番目に位置するセリンからNH₂-末端側に数えて-5~-3に位置する3連続アミノ酸配列Trp Leu Argを少なくとも含み、場合によっては、さらに-2から最長+6までのアミノ酸配列を含んでいてもよいペプチド、あるいは、-4から+2までの7連続アミノ酸配列Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro (配列番号13)を少なくとも含み、場合によっては、最長+6番目に位置するロイシンまでの配列を含んでいてもよいペプチド、または、HSP20ペプチドと高い相同性を示すαBクリスタリンのアミノ酸配列の内、NH₂-末端のメチオニンから数えて9番目に位置するトリプトファンから始まり、少なくとも14番目に位置するフェニルアラニンまでの6連続アミノ酸配列Trp Ile Arg Arg Pro Phe (配列番号26)、場合によっては、さらに15番目に位置するフェニルアラニンから最長17番目に位置するフェニルアラニンまでのアミノ酸配列で示されるアミノ酸を含んでいてもよいペプチドが血液循環障害予防および/または治療用医薬品として有効なことが判明した。

【0026】 より具体的には、16番目のセリンから数えて-5から-3までのアミノ酸配列Trp Leu Argを最小単位として含むアミノ酸配列からなるペプチドとしては、配列番号1のTrp Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu、配列番号2のTrp Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro Gly、配列番号3のTrp Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro、配列番号4のTrp Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu、配列番号5のTrp Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro、配列番号6のTrp Leu Arg Arg Ala Ser Ala、配列番号7のTrp Leu Arg Arg Ala Ser、配列番号8のTrp Leu Arg Arg Ala、配列番号9のTrp Leu Arg Arg、および配列番号10のTrp Leu Argのアミノ酸から構成されるペプチドが挙げられる。

【0027】 同NH₂-末端から16番目のセリンから数えて-4から+2までの7連続アミノ酸配列Leu Arg Arg Ala Ser Ala Proを最小単位として含むペプチドとしては、配列番号11のLeu Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu、配列番号12のLeu Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro、配列番号13のLeu Arg Arg Ala Ser Ala Proのアミノ酸から構成されるペプチドが挙げられる。

【0028】 また、HSP20ペプチドと高い相同性

を示すαBクリスタリンのアミノ酸配列の内、NH₂-末端のメチオニンから数えて9番目に位置するトリプトファンから始まり、少なくとも14番目に位置するフェニルアラニンまでの6連続アミノ酸配列Trp Ile Arg Arg Pro Phe (配列番号26)を最小単位として含むペプチドとしては、配列番号23のTrp Ile Arg Arg Pro Phe Phe ProPhe、配列番号24のTrp Ile Arg Arg Pro Phe Phe Pro、配列番号25のTrp Ile Arg Arg Pro Phe Phe、および配列番号26のTrp Ile Arg Arg Pro Pheからなるペプチドが挙げられる。

【0029】 本発明に係るペプチドを1種または2種以上を有効成分として含有する医薬用組成物は、通常医薬用の製剤化に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。製剤用の担体や賦形剤としては、固体または液体のいずれでもよく、例えば乳糖、ステアリン酸マグネシウム、スターチ、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコール等やその他常用のものが挙げられる。

【0030】 投与は、通常、静注等の注射剤、坐剤、経皮等による非経口投与のいずれかの形態が採用される。投与量は症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定されるが、通常成人1人当たり、1日につき1~1000mgの範囲で、1日1回から数回に分け静脈内投与されるか、または、1日1時間~24時間の範囲で静脈内持続投与される。もちろん、前記したように、投与量は種々の条件で変動するので、上記投与量範囲より少ない量で十分な場合もある。

【0031】 非経口投与のための注射剤としては、無菌の水溶性または非水溶性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等がある。このような組成物はさらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤(例えば、ラクトース)、溶解補助剤(例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸)のような補助剤を含んでいてもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化される。また、これらは無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水または無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

【0032】

【発明の効果】 本発明によりヒトHSP20またはそれと高い相同性を示すαBクリスタリンの一部アミノ酸配列を有するペプチドであって、上述したような特異的なアミノ酸配列を有する3ないし12個のアミノ酸から構成されるペプチドは、対照としてのHSP27と比較しても、極めて高い血小板凝集抑制作用、および/または

<;213>; Homo sapiens
 <;400>; 5
 Trp Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro
 1 5

<;210>; 6
 <;211>; 7
 <;212>; PRT
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 6
 Trp Leu Arg Arg Ala Ser Ala
 1 5

<;210>; 7
 <;211>; 6
 <;212>; PRT
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 7
 Trp Leu Arg Arg Ala Ser
 1 5

<;210>; 8
 <;211>; 5
 <;212>; PRT
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 8
 Trp Leu Arg Arg Ala
 1 5

<;210>; 9
 <;211>; 4
 <;212>; PRT
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 9
 Trp Leu Arg Arg
 1

<;210>; 10
 <;211>; 3
 <;212>; PRT
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 10
 Trp Leu Arg

1
 <;210>; 11
 <;211>; 11
 <;212>; PRT
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 11

Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu
 1 5 10
 <;210>; 12

<;211>: 9
<;212>: PRT
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 12

Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro
1 5

<;210>: 13
<;211>: 7
<;212>: PRT
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 13

Leu Arg Arg Ala Ser Ala Pro
1 5

<;210>: 14
<;211>: 6
<;212>: PRT
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 14

Leu Arg Arg Ala Ser Ala
1 5

<;210>: 15
<;211>: 5
<;212>: PRT
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 15

Leu Arg Arg Ala Ser
1 5

<;210>: 16
<;211>: 10
<;212>: PRT
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 16

Arg Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu
1 5 10

<;210>: 17
<;211>: 9
<;212>: PRT
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 17

Arg Ala Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu
1 5

<;210>: 18
<;211>: 8
<;212>: PRT
<;213>: Homo sapiens
<;400>: 18

Ala Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu

1 5

<:210>: 19

<:211>: 7

<:212>: PRT

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 19

Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu

1 5

<:210>: 20

<:211>: 6

<:212>: PRT

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 20

Ala Pro Leu Pro Gly Leu

1 5

<:210>: 21

<:211>: 5

<:212>: PRT

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 21

Pro Leu Pro Gly Leu

1 5

<:210>: 22

<:211>: 4

<:212>: PRT

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 22

Leu Pro Gly Leu

1 5

<:210>: 23

<:211>: 9

<:212>: PRT

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 23

Trp Ile Arg Arg Pro Phe Phe Pro Phe

1 5

<:210>: 24

<:211>: 8

<:212>: PRT

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 24

Trp Ile Arg Arg Pro Phe Phe Pro

1 5

<:210>: 25

<:211>: 7

<:212>: PRT

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 25

Trp Ile Arg Arg Pro Phe Phe

1 5

<:210>: 26

<:211>: 6

<:212>: PRT

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 26

Trp Ile Arg Arg Pro Phe

1 5

<:210>: 27

<:211>: 5

<:212>: PRT

<:213>: Homo sapiens

<:400>: 27

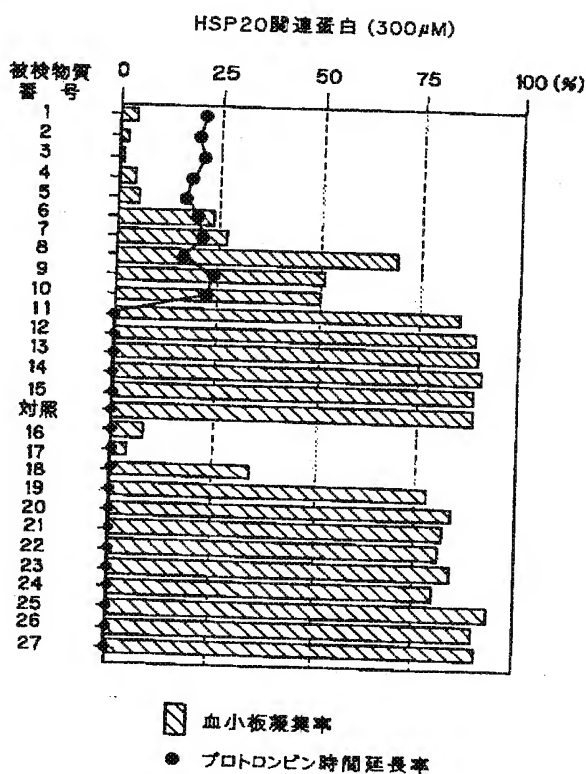
Trp Ile Arg Arg Pro

1 5

【図面の簡単な説明】

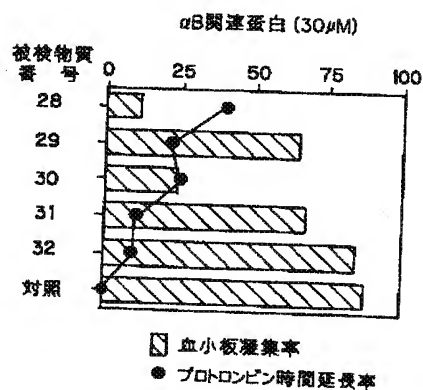
【図1】 被検物質番号1～27の血小板凝集率およびプロトロンビン時間延長率を対照との比較で示すグラフである。

【図1】



【図2】 被検物質番号28～32の血小板凝集率およびプロトロンビン時間延長率を対照との比較で示すグラフである。

【図2】



フロントページの続き

| (51) Int. Cl. | 識別記号 | F I | テ-リ-ド (参考) |
|---------------|---|------------|---|
| C 07 K | 7/06 | A 61 K | 37/02 |
| (71) 出願人 | 593232446 加藤 兼房 愛知県名古屋市名東区富が丘20-1 | (72) 発明者 | 丹羽 雅之 岐阜県岐阜市岩田西1-628 |
| (71) 出願人 | 500140301 植松 俊彦 岐阜県岐阜市本荘3680-15 | (72) 発明者 | 加藤 兼房 愛知県名古屋市名東区富が丘20-1 |
| (72) 発明者 | 小澤 修 愛知県春日井市篠木町3丁目-47 | (72) 発明者 | 植松 俊彦 岐阜県岐阜市本荘3680-15 |
| (72) 発明者 | 松野 浩之 岐阜県本巣郡北方町高屋白木2丁目60 | F タ-ム (参考) | 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA02 BA10 BA15 BA16 BA17 BA23 NA14 ZA362 ZC022 4H045 AA10 AA30 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 CA40 EA23 |